

## REMARKS

The claims are 1 to 4 and 6 to 11.

Claims 1, 3, 4 and 6 to 11 stand rejected under 35 U.S.C. § 103(a) as being unpatentable over Japanese Patent Application Publication 06-040801 (hereinafter the Wada '801 publication) in view of Japanese Patent Application Publication 05-038284 (hereinafter Takama '284 publication).

As pointed out by the rejection, although the Wada '801 publication teaches utilizing starch present at a concentration from 0 g/L to 80 g/L within said organ transplant preservation perfusion solution, the Wada '801 publication does not explicitly teach utilizing an inulin fructan oligosaccharide within said organ transplant preservation perfusion solution, as instantly claimed, this deficiency is said to be overcome by Takama '284.

This rejection is respectfully traversed.

1. Please note that trehalose is a polymer of glucoses obtained by binding glucose and glucose, likewise starch. 1-kestose (GF2) and nystose (GF3) are also polymers of glucose sugars and fructose sugars, as the Examiner points out. It is well known to one skilled in the art that there are many different types of polymers of sugars since there are many different types of monomer sugars such as glucose, fructose, mannose, glucose, and so on and various styles of binding modes between sugar and sugar in the polymer.

As can be seen from Table 1 of the present specification, compositions comprising trehalose (Comparative Examples 8 to 11) are actually inferior to that comprising 1-kestose or nystose in respect of the preservation of organs. Thus, one skilled in the art could not easily select the claimed polymer of sugars from among the many different types of polymers, in view of the advantageous effect concerning the preservation of organs.

2. On page 4, last paragraph of the Office Action, the rejection states that it would have been *prima facie* obvious to one of ordinary skill in the art to substitute a 1-kestose inulin fructan oligosaccharides for the starch ingredient present within the organ transplant preservation perfusion solution of the Wada publication. Applicants respectfully disagree.

Please note that while the solution of the Wada publication comprises a starch ingredient (i.e., hydroxyethyl starch), the solution must comprise trehalose as an essential ingredient. The

purpose of the invention of the Wada publication is to solve the problem with the conventional organ transplant preservation solution comprising raffinose by replacement of raffinose with trehalose. On the other hand, please note that while starch has been used as a colloid osmo-regulator in the Wada publication, starch can be also included as ingredient (h) in the composition of the present invention.

Therefore, even if starch within the solution of the Wada publication could be replaced with 1-ketose inulin fructan oligosaccharides, the composition of the present invention could not be obtained since the cited references do not teach or suggest exclusion of trehalose from the organ transplant preservation solution.

In the paragraph bridging pages 8 and 9 of the Office Action, the rejection maintains the position in the previous final Office Action mailed August 30, 2006. In this connection, the rejection states on page 5 of the Office Action that one of ordinary skill in the art at the time the instant application was filed would have had a reasonable expectation of success in combining the teachings of the Wada publication and the Takama publication, since organs are simply an aggregation of a plurality of live cells having a specialized function.

In reply, it is difficult to combine the teachings in view of the specific technical problems with organ preservation.

In this regard, submitted herewith is an article entitled "Advances in organ preservation" by M. Mito and M. Kusano (SYOUKAKI GEKA (i.e., Digestive Surgery), 7(13), pp.1949-1956, 1984). The article relates to the reports on the latest research developments in organ preservation techniques and the problems to be solved at that time.

On page 1949, left column, lines 15 to 19 of this article, it is disclosed as follows:

*"In other words, although organ preservation finally targets on the preservation of an organ for a long period or further for semi-permanent period, even kidney, which is considered comparatively resistant to ischemia, can be preserved only for about a week, to say nothing of liver, which can be preserved only for about 48 hours at most<sup>1) 2)</sup>, and thus liver preservation for a long period is in fact an empty dream of the day."*

On page 1950, left column, lines 30 to 35 of this article, it is disclosed as follows:

*"Also in the liver preservation by perfusion, the organ is in good preservation at the initial stage of perfusion, but edemata become observed microscopically around the central veins of liver and around the blood vessels of Glisson capsule at the passage of*

*time for preservation. As a result, insufficient perfusion is caused in liver, and the weight of the liver is also increased along with edemata in the whole liver. This is the main cause of that the liver preservation by perfusion is successful only in a short period."*

On page 1950, right column, lines 18 to 26 of this article, it is disclosed as follows:

*"Most of these preservations by perfusion are provided on the basis of test results in kidney. Belzer et al.<sup>15)</sup> applied the perfusion condition at a low flow rate with cryoprecipitate using hypothermia to liver preservation, but the liver could be preserved only for 10 hours. It is perceived as the cause that liver and kidney are different in sensitivity to anoxia and uneven perfusion is observed after a long period and thus liver is susceptible to local ischemia as compared with kidney. The main cause is suspected to be the destruction of sinusoidal endothelial cells as already indicated by Grana<sup>20)</sup>."*

Thus, it is disclosed that the conventional method for organ preservation may functionally and histogenetically impair organs. Accordingly, it is apparent that the preservation of live cells could not cause such impairment since the impairment relates to the function and structure of organs themselves.

On page 1954, left column, lines 15 to 21 of this article, it is disclosed as follows:

*"It is common knowledge for the normal function of liver in vivo that the liver must be provided with not only hepatocytes but also the structure and function of microcirculation in order to maintain their function. The same may be said also in whole liver freezing or preservation by perfusion, but the difficulty of liver preservation may consist substantially in the destruction of the microcirculation of liver during various preservation stages rather than the impairment of hepatocytes themselves."*

Thus, it is disclosed that the difficulty of organ preservation may consist substantially in the destruction of the microcirculation of the organ during various preservation stages rather than the impairment of live cells themselves. In other words, in order to successfully preserve organs, we must avoid not only the impairment of live cells themselves, but also the destruction of the microcirculation of organs.

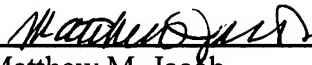
Although the rejection contends that organs can be successfully preserved based on the findings on preservation of live cells, it is apparent that it does not consider the problem with the destruction of the microcirculation of organs at all.

One skilled in the art could easily realize that organs could not be treated in the same manner as cells themselves. Therefore, the rejection is untenable.

Favorable action on the merits is now requested.

Respectfully submitted,

Yoshihiko MASAKI et al.

By:   
Matthew M. Jacob  
Registration No. 25,154  
Attorney for Applicants

MJ/aas  
Washington, D.C. 20006-1021  
Telephone (202) 721-8200  
Facsimile (202) 721-8250  
October 31, 2007

## 臓器保存法の進歩\*

水戸 勉郎\*\* 草野 満夫\*\*\*

- 要旨：①肝の保存についてこれまでの研究成果について述べるとともに、それぞれの保存法の問題点を明らかにした。  
 ②また保存成績の向上につながると考えられる membrane stabilizer, 人工血液などの応用とそれらの有効性について言及した。  
 ③屍体肝のドナー肝としての有用性について、肝の凝固血時間との関連性も含めて実験的データを中心にして述べた。  
 ④肝の長期保存が最も期待しうる凍結保存の可能性について、われわれがこれまで行ってきた①灌流肝細胞の凍結保存とその移植、②胎児肝組織の凍結保存とその移植という二つの実験系より論じた。  
 ⑤全肝凍結保存の予備実験より、肝の脈洞を中心とした微小循環系の組織構築の維持が肝の保存において最も重要であることを強調した。

## はじめに

血管吻合と臓器移植という研究業績で1912年にノーベル生理学賞に輝いた Alexis Carrel は、血管吻合法を確立し、その技術を駆使し、甲状腺、腎の移植、さらに種々の臓器の保存研究を行ったが、彼のこれら一連の研究が、近代の臓器移植、臓器保存研究の幕明けといえる。

それから1世紀近くの間に、枚挙にいとまがないほどの臓器移植に関する研究が行われ、すでに臓器移植は技術的には確立され、また1970年代に登場した Cyclosporin-A に代表されるごとく、免疫抑制に関しても飛躍的な発展をとげ、腎臓、肝臓、心臓移植の臨床例も年々増加の一途をたどっている。しかし、この免疫抑制と並んで臓器移植のもう一つの課題である臓器保存に関しては、多くの研究者が精力的に研究を進めているにもかかわらず、現在まであまり大きな発展が残念ながらなかったといえる。

すなわち臓器保存の究極的な目標は、臓器の長期、さらに半永久的保存であるが、比較的 ischemia に強い腎でさえも、現在その保存可能期間は1週間前後であり、まして肝においては48時間前後の保存が限界で<sup>1)</sup>、肝の長期保存は現代の夢物語であることも事実である。

ドナー臓器をいかに獲得するかが、本邦でもまた欧米においても肝移植を遂行するうえで最も重要な課題であることを考えると、脳死の問題のみならず、肝の保存についても決し

て看過することはできない問題である。また肝の摘出から移植まで、いかに摘出肝の viability を良好に維持するかという問題も、短期間の保存ではあるが、摘出肝の輸送という問題もからんで重要な課題の一つである。

今回これらの視点から、まず肝の保存についてのこれまでの研究成果について述べ、次にその研究結果をもとに肝の長期保存を困難ならしめている要因がどこにあるのかを明確にすると同時に、現在その長期保存法として期待される凍結保存の可能性について、われわれがこれまで行ってきた肝細胞および胎児肝組織の凍結保存とその移植実験から言及し、肝の長期保存への one step としたい。

## I 肝保存研究のこれまでの歩み

## 1. 単純保存

Goodrich<sup>2)</sup> は、1966年にヘパリナイゼーションのみでの肝保存を試み、肝動脈と大動脈のポリエチレンチューブによる血行再建法を用いた移植実験で、その保存時間は33分が限界であったとしている。また、1960年に Moore ら<sup>3)</sup> はイスの腹腔内に冷却した等張の生理食塩水を入れ、肝を腹腔内で保存し、摘出後門脈より生理食塩水で灌流後移植する実験を行った。その結果、30～45分が保存可能であり、最長生存期間は12日間であったと報告している。これらの実験は、きわめて単純な保存法ではあるが、肝の ischemia に対する許容限界は30～45分であることを示す基礎的なデータとして重要である。

これらの保存法を一步前進させたのが Starzl<sup>4)</sup> で、1960

\* Advances in liver preservation

\*\* 旭川医科大学第二外科教授 \*\*\* 同講師

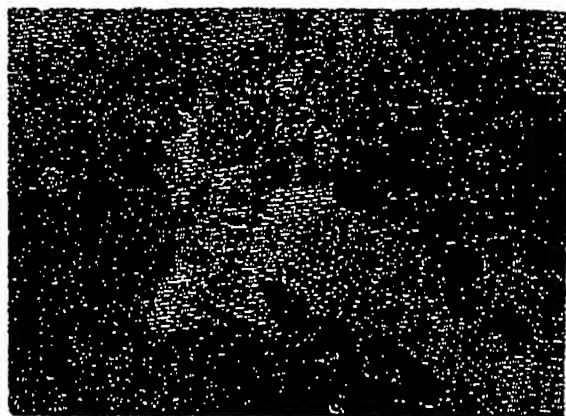
年に彼はイヌを ice bath に浸漬し、体温を 30~15℃ に冷却し、さらに冷却ラクテートリンガー液にて肝を門脈より灌流し、その保存状態を同所性の移植実験にて判定した。その結果、120 分の保存が可能であったが、それ以上の保存では、いわゆる "outflow block" が起こり移植に成功しなかった。また彼は、1963 年に臨床例において<sup>9)</sup>、大腿静脈より 15℃ になるまで 45~105 分灌流後、肝を摘出し、冷ラクテートリンガー液にて washout した肝を用いて 3 例に移植した。1 例は出血傾向で死したが、2 例はその移植に成功したと報告している。彼がイヌの実験で指摘した outflow block に関しては、それ以前より、多くの肝の摘出実験からその現象の存在が知られ、機序解明が試みられてきた。これまで hypoxia の肝より vasoactive な物質が遊離され、その結果、流出調節機構として顆洞および静脈系に存在する平滑筋が収縮するためと解釈されており、これらとくに発達しているイヌにおいてその現象が顕著にみられると推測されているが<sup>1)</sup>、現在なお十分に究明されていない。この現象も種差があり、Eiseman ら<sup>10)</sup> はヒトの屍体肝灌流実験からこの outflow block はヒト肝にはみられなかったと報告している。

## 2. 灌流保存

これまでの研究でも肝灌流がとり入れられているが、これは灌流によって保存するという目的ではなく、いわゆる washout を目的としたもので、この灌流によってより長期間の保存を可能ならしめようという試みが、1961~1963 年に Kestens ら<sup>11)</sup> によって行われ、彼は 3 時間の灌流保存に成功している。それ以後、肝の灌流保存が主流となり、灌流液の改良、低温、高圧酸素下での灌流と種々の保存法が試みられるようになった。Kestens ら<sup>12)</sup> は 1968 年に 15℃ の低温灌流で 120 分の保存に成功しており、Turner<sup>13)</sup> も 20 時間の保存が可能であることをイヌの同所移植で実証した。この灌流保存についても、灌流初期は良好な保存状態を保つが、灌流時間が長くなるにつれて光顕的に中心静脈周囲、およびグリソン系の血管周囲に浮腫がみられ、その結果灌流不全状態を呈し、肝全体の浮腫を伴い肝重量も増加する。このことが、灌流保存が短時間のみでしか成功しない一つの要因ともなっている。

### 1) 高圧酸素下保存

この灌流中にみられる肝の浮腫抑制と肝組織の oxygenation をはかる目的で、1967 年 Slapack<sup>14)</sup>、1968 年 Brettschneider ら<sup>15)</sup> は、高圧酸素下での灌流保存を行った。希釈血液を低流量で門脈より灌流し、40 pound/inch<sup>2</sup> の高圧酸素下で保存した。その結果、24 時間保存した肝を移植した 8 頭のうち 3 頭が 8 日間以上生存し、比較的良好な保存成績が得られた。しかし、この高圧酸素下保存では、肝が oxygenation されるのは肝表面の数 cm の深さまでであり、その利点は肝の oxygenation というよりは、むしろ高圧下における代謝の抑制、vascular system の浮腫の抑制 (outflow block を起こ



内皮細胞 (end) の破壊と顆洞 (S) への遊出像がみられる

図 1 屍体内 45 分保存、washout 後のイヌの肝の電顕像

しにくい) などにある。本法は、加圧、減圧時に微妙な手技が要求されるなどの問題もあり、臨床応用までには至らなかった。

### 2) 灌流条件の改良

1970 年代に入り、灌流液の組成について種々の改良実験が行われるようになった。前述した希釈血液 (Brettschneider<sup>11)</sup>; 1968)、さらに低分子デキストラン、ヘモグロビン (Hinchliffe<sup>16)</sup>; 1970)、さらに cryoprecipitate plasma (Hinchliffe<sup>16)</sup>; 1970, Belzer<sup>17)</sup>; 1970, Petrie ら<sup>18)</sup>; 1973) などを用いての灌流保存実験が試みられたが、せいぜい 12 時間程度の保存が可能であったのみで、これらの方法によっても大幅な保存時間の延長は不可能であった。また灌流圧も low flow (Belzer<sup>17)</sup>; 1970)、high flow (Petrie ら<sup>18)</sup>; 1973)、さらに間欠的灌流法 (Calne<sup>19)</sup>; 1972, 出月<sup>20)</sup>; 1972)、など種々の灌流条件での保存実験が続けられてきたが、Petrie ら<sup>18)</sup> そして Calne<sup>19)</sup> の 17 時間保存、Toledo-Pereyra ら<sup>21)</sup> の 24 時間保存が最長で、24 時間の壁は破れなかった。これらの灌流保存法の多くは腎での成績をもとにして設定しており、Belzer ら<sup>17)</sup> は低温下に cryoprecipitate による低流量での灌流条件を肝の保存に応用したが、その保存も 10 時間が限界であった。その原因として、腎と肝との anoxia に対する sensitivity に相違があり、長時間の灌流により不均等な灌流がみられ、それにより局所乏血が腎に比べ起こりやすいことが考えられ、その主たる原因は、1968 年にすでに Grana<sup>22)</sup> によって指摘されているが、顆洞内皮細胞の破壊であると推測されている。

われわれも屍体内保存肝移植実験で保存時間の延長に比例して灌流後の内皮細胞の破壊、および顆洞壁よりの脱落を電顕的に確認している (図 1)<sup>23)</sup>。すなわち灌流時間が長くなるにつれて肝細胞および内皮細胞の膨化が進み、その結果、顆洞圧の上昇がみられ、しだいに灌流状態が悪化し、さらに肝の浮腫が増強され、灌流不全が顕著となるという“悪循環”

が、この灌流による長期保存を困難ならしめている主たる要因としてあげられる。Calne によって試みられた間欠的灌流法は、これらの点を考慮した方法として評価できる。

以上述べたごとく、多くの研究により種々の肝保存法とその改良実験が行われてきたが、24時間以上の保存は困難であった。しかし、確実に12時間程度の保存は可能となり、摘出臓器の輸送に必要な短期保存の目的は一応達したといえる。臓器の輸送という観点からみると、保存法は可及的に簡便な方法が望ましい。保存法に種々の改良が加えられ、その灌流液および装置が複雑化してきているが、結果は決してそれに見合ったものではなく、また保存法は簡便な方法へと逆行しつつある。Calne ら<sup>23</sup> による、plasma protein fraction にて flush し、その後 ice bath に保存するという単純な方法で、ヒトの肝は輸送に必要な2~4時間の ischemic time に十分耐え、12人中6人の移植に成功しているとの報告は、ややもすると理論だけが先行し、複雑化する保存法への警鐘ともいえよう。

## II その他の肝保存法とその歴史

### 1. 低温および subzero 下での保存

これまでの低温生物学領域での多くの研究から、低温下においては臓器の代謝機能が抑制され、その機能形態も温存されることは明らかである。肝についても著者ら<sup>24</sup>が行った低温下での阻血実験で26℃下での肝は、阻血時では30分が限界であったのに対し、90分までの延長が可能であったという実験結果からも低温下での保存の有効性が示された。肝の保存実験においても門脈より冷却ラクテートリンガー液での灌流、また4~10℃の低温下での浸漬保存などが積極的に試みられてきた。しかしこの低温下での保存においても大幅な保存時間の延長をみることはなかった。また1964年に Brown ら<sup>25</sup>によって行われた肝の非凍結、超低温 (subzero) 下保存実験で、彼は-6℃下で5日間保存した肝を移植したが、全例12時間以内に死亡したと報告しており、超低温下でも肝の長期保存は不可能であった。その理由として Lambotte らは低温段階で不均衡な代謝抑制が起こることをあげており、その例として Na と K イオンの細胞内外への輸送が20℃と5℃の条件下ではまったく逆転することを観察している。このように低温下保存も常温下より保存性が優れているものの多くの問題点を含んでおり、本法のみでの肝の長期保存は現在のところ困難である。

### 2. 血管作動物質の応用

保存移植し血流再開後にみられる outflow block については前述したが、ほとんどの保存不良の肝は移植後この outflow block を惹起し、その結果、腸管系のうっ血をきたし、移植後数時間で死亡する。この outflow block の主たる原因と考えられている肝微小循環系の spasms に対して、

procaine<sup>26</sup> さらに sympaticomimetic ナイソプロテンロール (Lambotte<sup>27</sup>; 1973) を灌流中に添加し、保存時間の延長をはかる試みも行われてきた。こうした vasoactive な薬物は、単に spasms を除去し血管抵抗を減少せしめ血流量を増加させ、良好な血行状態を再現する可能性があるのみならず、これらの薬剤は Na イオンの肝細胞膜からの透過性を減少させる効果もあるといわれている<sup>28</sup>。

### 3. membrane stabilizer の応用

こうした薬理作用を期待して、その後も phenoxybenzamine<sup>29</sup>, chlorpromazine<sup>30</sup>, さらに glucocorticoids (Rangel<sup>31</sup>; 1969) などが、一方では肝細胞膜およびライソゾーム膜安定剤として用いられてきた。しかし Totovic ら<sup>32</sup> は prednisolone を投与しても何らの効果が得られなかったとしており、これらの薬剤は outflow block を軽減させ、また membrane stabilizer としての効果もある程度認められるが、これらの薬剤を使用しても保存時間の大幅な延長は今後とも期待できないであろう。

しかし、最近プロスタグランジンの誘導体の一つである prostaglandin I<sub>2</sub> (prostacyclin) の ischemia, shock などにみられる循環障害、細胞膜障害に対する予防効果が認められ、この薬剤はさらに血小板凝集抑制、ライソゾーム膜安定作用、さらに血流増加作用があることが確認されている<sup>33-35</sup>。Araki ら<sup>36</sup>はこの prostacyclin を肝灌流液に用い、灌流液中の LDH, cathepsin D の逸脱がコントロール群に比しきわめて少なかったとし、本剤の有効性を示した。また Monden ら<sup>37</sup>は prostacyclin を用い、Sack's 液にての灌流後、3℃の低温下で48時間保存し、さらに同所性に移植したところ、5頭中3頭が6日以上も生存したとの報告は注目される。

### 4. 人工血液の応用

また酸素運搬能を有する fluorocarbon を用いた肝保存の研究が Kamada ら<sup>38</sup>によって行われ、ラットを用い10℃下で0.15~0.2ml/g の低流量での持続灌流を行い、22時間の保存に成功している。本剤の使用にあたっては、fluorocarbon の肝および生体に及ぼす毒性の問題を解決する必要がある。さらにこの perfluorochemical emulsion の一種である Fluosol-DA 20% は、もうすでに臨床に用いられており、また肝灌流<sup>39</sup>、屍体灌流<sup>40</sup>に応用され、その有効性も確かめられている。また本剤は比較的安全であり、大量投与により Kupfer 細胞など網内系細胞での取り込みの増加がみられ、これらが肝および生体にいかなる悪影響を与えるかという疑問は残るが、肝保存にも十分使用しうる薬剤と考える。

## Ⅱ 肝の温阻血時間 (warm ischemic time, WIT) での耐容性について

肝は生体内臓器のなかでも脳に次いで阻血に対する耐容性が低い。しかし人間の肝はイヌに比べるとやや阻血に対する抵抗性は強いものの、その許容時間は20~30分が限界とされている。

本邦のように脳死がまだ認められていない現在、腎と同様、屍体肝を移植肝として使用しようとする方向も無視できない。Van Wykら<sup>14)</sup>は、ブタを用いて犠牲死後の肝の代謝機能を経時的に検索し、死後3時間以内に血行再建すれば生存するだろうと述べているが、灌流実験のみで移植を試みているので、その信頼性は低い。また Fonkalsrud ら<sup>15)</sup>は、イヌを用いて犠牲死直後に肝を摘出、washout 後移植したが3日以上生存したイヌは24頭中2頭のみであったとし、この実験結果は屍体肝をドナー肝として利用することの困難性を示唆した。しかし、1973年に著者らも含めた北大第一外科グループ<sup>16)</sup>は、同様に常温下での屍体内保存限界に関する実験を行った。その成績は死後30分以内の保存では最長8日、6日生存が2例であり、そのうち30分保存群では1頭が6日生存した。しかし、45分保存群では2日、3日、24時間の生存時間で60分保存群では2頭とも24時間以内に死亡した。この実験により、イヌ肝の常温保存、すなわち WIT の限界は30分であり、死後30分以内であればその肝はドナー肝として使用しうることを実際に同所性移植によって実証した。さらに、肝はきわめて温阻血に脆弱で、この WIT を可及的に短縮することがドナー肝の良好な viability を保持するうえで、いかに重要であるかを示した実験系といえよう。

## Ⅳ 肝の長期保存の可能性を求めて——肝の凍結保存について——

これまで述べてきたごとく、多くの研究者により肝保存の研究が行われてきたが、その保存可能時間は48時間程度にすぎない。今後、これまでの低温、灌流保存法は、いかなる改良を加えても大幅な保存時間の延長は期待できないであろう。肝の長期保存には、これまで細胞の保存などで用いられている凍結保存以外にはないと考えられる。しかし肝の凍結保存はきわめて困難で、過去にも試みられたがその成績は惨憺たるものである。Moas ら<sup>17)</sup>は、グリセロールを凍害防止剤として使用し、-20℃で凍結し1~14日間保存したが、全例移植後6時間以内に死亡している。Zimmerman ら<sup>18)</sup>はウサギの肝を-60℃まで凍結し、210日保存した肝について water bath で解凍後、肝の機能を *in vitro* にて確認しているが、移植後の生着はみられていない。他の臓器としては、腎では Toledo-Pereyra ら<sup>19)</sup>が-85~-120℃で保存し、10頭中3頭成功し、Zimmerman は脾と十二指腸同時に-60℃に保存後移植し、移植後の血糖調節をみたしと報告している<sup>18)</sup>。

-196℃の液体窒素下での保存には、Toledo-Pereyra<sup>19)</sup>が pancreas で  $4.4 \pm 2.3$  日の平均生存をみ、また Hamilton ら<sup>20)</sup>は小腸の-196℃下での保存に成功している。

われわれは、これまで遊離肝細胞の脾内移植実験<sup>21)</sup>の一環として、細胞レベルとして肝細胞、組織レベルから胎児肝組織の凍結保存とその移植実験を行い、それぞれ長期間の保存とその移植に成功している。今回これらの実験から得られた結果をもとに、肝の凍結保存の可能性について言及したい。

### 1. 肝細胞の凍結保存とその移植

従来、種々の細胞の凍結保存実験が試みられているが、分離肝細胞の保存に関する研究<sup>22)</sup>はきわめて少なく、そこでわれわれは、これまでの赤血球、精子、腫瘍細胞などの凍結保存法に準じて行った。

酵素消化法にて肝細胞を遊離し、凍害防止剤として 10% dimethylsulfoxide (DMSO) を添加した緩衝液にて 4℃ 20分間、soaking の目的で放置し、さらにプログラミングフリーザーにて 1℃/min の cooling rate で -80℃ まで凍結し、その後 -196℃ の液体窒素下に保存した。一定時間保存後 37℃ の water bath にて解凍し、トリンプルーにて viability 算出後、同系ラット脾臓内に移植した。予備実験として行った室温 4℃、-20℃、-80℃、-196℃ の各保存条件下での肝細胞の viability の変化は、非凍結群で室温では6時間、4℃ では24時間目より急激な viability の低下をみる。また凍結群では -20℃ は1週間、-80℃ では1カ月目より低下しはじめる。-196℃ 下では、保存開始初期に10%前後の viability の低下を認めるのみで、1カ月以上経過してもその低下はみられなかった。この結果はこれまでの腫瘍細胞の凍結保存と同様の成績で、肝細胞においてもその長期保存には -196℃ 下が最も適していることが実証された。

さらにこれら保存肝細胞の真の viability を判定する目的で、その移植実験を行った。これまで、-20℃ 3日間保存移植3日目、-196℃ 1週間保存移植1週目、1カ月保存移植1週目、最も長期間の保存は16カ月間保存し移植19カ月目にその生着を確認している(図2)。その生着状態は正常肝細胞に比べ不良であるが、明らかに脾内に凍結保存後移植された肝細胞は分裂・増殖をきたしている。

遊離肝細胞の凍結保存とその移植に成功したのは、われわれの実験がはじめてであり<sup>23,24)</sup>、その後 Fuller ら<sup>25)</sup>によって追試されている。実験初期のころ、底のやや広い試料管に遊離肝細胞を入れて保存したが、満足すべき結果が得られず、その後、牛精子保存用 0.5ml の plastic paillette に入れ保存するようになり良好な成績が得られるようになった。このことは、凍結および解凍段階でみられる温度勾配が各肝細胞および細胞の表面、深層部において、可及的均等になるようにする必要があることを示唆する。また、凍害防止剤を



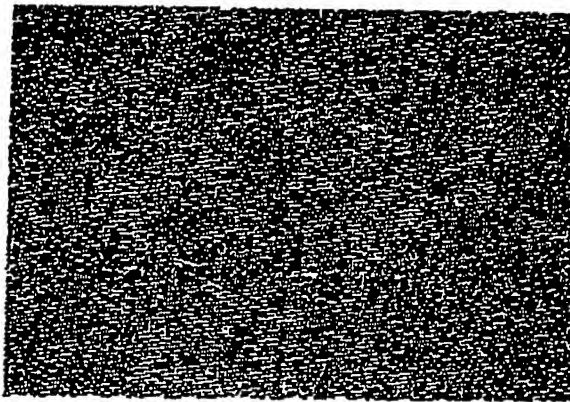


図2 -196℃下16ヵ月保存、脾臓内移植19ヵ月目の肝細胞 (HE染色)

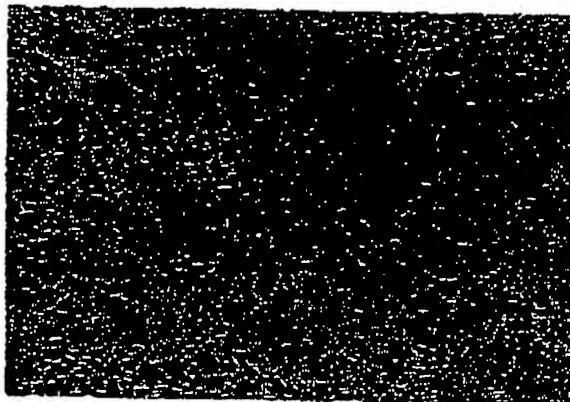


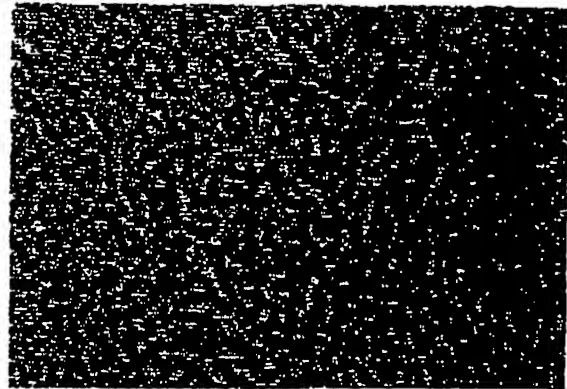
図3 脾臓内移植凍結保存胎児肝組織 (-196℃下、1ヵ月保存、移植6ヵ月目)

すみやかに各肝細胞深部まで浸透させることも重要である。

## 2. 胎児肝組織の凍結とその移植

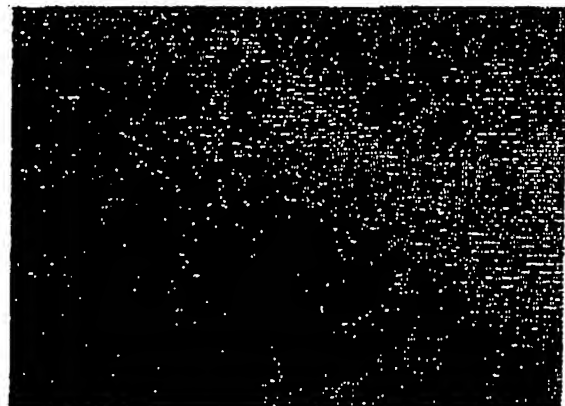
遊離肝細胞凍結とはほぼ同じ方法によって凍結保存したが、cooling rate は 4℃/min とした。妊娠18日目の胎児肝を摘出し、はさみで約 1mm<sup>2</sup> の組織片に mincing し、10% の DMSO を凍害防止剤として加えた。教室の江端ら<sup>(4)</sup>がすでに正常胎児肝組織の移植に成功しており、教室の塚ら<sup>(5)</sup>によって凍結保存が試みられたこの胎児肝組織は図3に示すごとく、移植後同系ラット脾臓内に生着した。その生着状態を正常肝細胞、正常胎児肝組織移植時のそれと比較検索しているが、ほぼ正常に近い生着状態を示す。

組織片の凍結とその保存に関しては、過去、皮膚、副甲状腺などに試みられており、それぞれ良好な結果が得られているが、この組織片移植の凍結保存の成否は、組織片の大きさに左右されることが多い。すなわち凍害防止剤がより均等に浸透され、さらに凍結、解凍段階での急激な温度変化に対して、組織内において可及的均一な温度勾配が得られることが、より良好な保存状態を保つうえで必須の条件である。



核の濃縮が顕著である以外、索構造、個々の肝細胞の変化はそれほど著明ではない

図4 -196℃下1ヵ月全肝保存の HE 染色



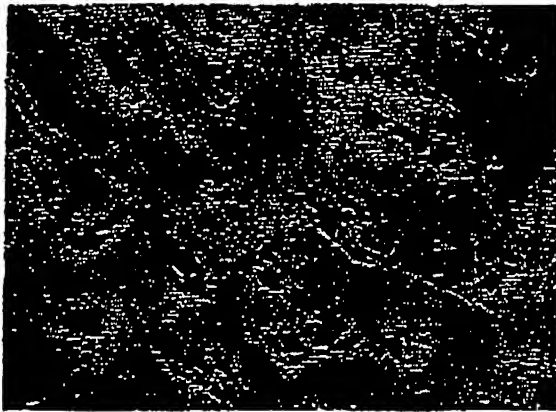
肝細胞(H)の胞体には腫大した糸状体、グリコーゲン顆粒の消失などの所見がみられ、さらに細胞膜の連続、Disse 腔の消失など顆粒(S)の障害が顕著である

図5 -196℃下1ヵ月全肝保存の電顕像

## 2. 全肝凍結保存へ

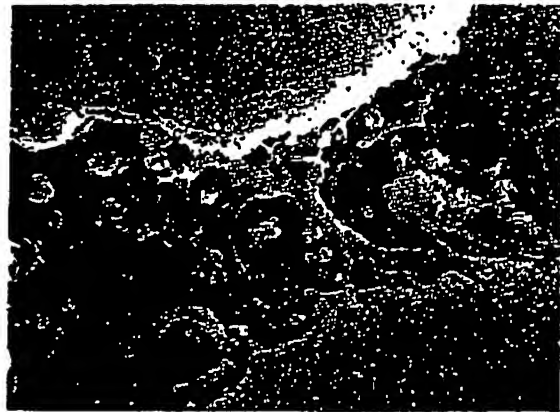
遊離肝細胞、さらに再生力旺盛な胎児肝ではあるが、その組織の凍結保存は可能であった。しかし、その全肝保存は過去の報告をみてもまったく成功していない。われわれは、全肝の凍結保存がどのような組織形態学的障害をもたらすのかを知る目的で、肝細胞および胎児肝組織移植実験から得られた知識をもとに、全肝凍結の予備実験を行った。

まず凍害防止剤の均等な浸透をはかるために、門脈から約20分間 DMSO 添加緩衝液にて灌流後、プログラミングフリーザーにて 4℃/min の cooling rate で凍結、-80℃になったところで-196℃ 下に移し保存した。解凍は表面部と深部とが可及的均等に行われるよう microwave を用いた。図4は -196℃ 1ヵ月保存後の肝の HE 染色である。核の濃縮が顕著であり、肝細胞膜の軽度の不整がみられるが、肝細胞および肝細胞索構造の大きな乱れは認められない。光顕で観察する限りでは、比較的良好的な保存状態を示していると考えられるが、この肝を透過および走査型電顕で観察すると、



保存前後に灌流したが、類洞内腔は細胞成分、血球などで充満している

図6 -196℃下1ヵ月保存した全肝の走査電顕像



内皮細胞の fenestration は拡大、破壊され、円滑な類洞腔の特徴を失っている (H:肝細胞, S:類洞)

図7 -196℃下1ヵ月保存の全肝の類洞内皮細胞の走査電顕像

高度な障害をきたしていることがわかる。透過電顕では肝細胞内には小空胞、糸粒体の軽度の腫大、ミエリン小体の出現などがみられるが、電顕上壊死に陥っている所見はみられない。しかし肝細胞膜、とくに類洞面の膜構造の破壊、microvilliの消失、さらに内皮細胞の遊離、離脱が顕著であり、肝細胞の障害もそれに加わり、類洞構造の顕著な破壊像が認められる(図6)。これらの所見は走査型で観察するとさらに明確となる(図6,7)。類洞壁細胞の破壊、それにより類洞腔内は破壊、壊死に陥った細胞成分、その他の血液成分で充満しており、さらに拡大して観察すると、正常ではきわめて滑らかな内腔像を呈する内皮細胞も fenestration は著明に拡大し、その微細構造上の特徴を完全に失っている。この内皮細胞の所見は1968年に Grana<sup>20)</sup> が灌流保存の限界の一つとしてすでに指摘しているが、この全肝凍結時にもまた同様な所見が観察された。

生体内においても同様であるが、肝が正常な機能を保つうえで、肝細胞のみならずその機能維持にはそれに伴う微小循環の構造と機能が備わっていなければならないことは周知の事実である。全肝凍結、灌流保存でも同様のことがいえるが、肝細胞それ自体の障害よりはその微小循環系が種々の保存段階で破壊されるとともに肝の保存の困難性の最も本質的なところがあると考へたい。

#### まとめ

肝の保存の苦しい問題は、*in vitro* における形態、生化学的な検索でもある程度判定しうるが、最終的にはその可移植性で判定する必要がある。Kamada ら<sup>21)</sup> の精力的な研究により cuff technique を用いた肝移植の技術なども確立されたが、その移植実験は犬、小動物にかぎらずけて容易ではない。またその成績も技術的な factor によって影響されることも否定できない。それだけに肝の保存研究は、労力がかかる割にその成果は少ない。

まず保存実験を行うにあたっては、*in vitro* での検索を十二分に行う必要がある。生化学的なデータも必要であるが、まず形態的な構造の変化をよく観察することが第一歩であり、生化学的なデータが良好であっても、その組織構造に irreversible な変化がみられた場合、けっして長期の生着は望めないだろう。肝の保存実験におけるこれまでの研究経過の概要とその長期保存の一つの試みとしての全肝凍結保存の問題点につき述べた。

#### 【参考文献】

- 1) Monden, M. and Fortner, J. G.: Twenty-four and 48-hour canine liver preservation by simple hypothermia with prostacyclin. *Ann. Surg.*, 196: 38~42, 1982.
- 2) Sung, D. T. W. and Woods, J. E.: Forty-eight-hour preservation of the canine liver. *Ann. Surg.*, 179: 422~426, 1974.
- 3) Goodrich, E. O. Jr., Welch, H. F., Nodson, J. A., Beecher, T. S. and Welch, C. S.: Homotransplantation of the canine liver. *Surgery*, 39: 244~251, 1956.
- 4) Moore, F. S., Wheeler, H. R., Demissie, H. V., Smith, L. L., Balankura, O., Abel, K., Greenberg, J. B. and Dammln, G. J.: Experimental whole-organ transplantation of the liver and of the spleen. *Ann. Surg.*, 152: 374~387, 1960.
- 5) Starzl, T. E., Kaupp, H. A., Brock, D. R., Lazarus, R. E. and Johnson, R. V.: Reconstructive problems in canine liver homotransplantation with special reference to the postoperative role of hepatic venous flow. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 111: 733~743, 1960.
- 6) Starzl, T. E., Marchioro, T. L., von Kaula, K. N., Hermann, G., Brittain, R. S. and Waddell, W. R.: Homotransplantation of the liver in humans. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 117: 659~676, 1963.
- 7) Daria, J. C.: Experiences in ex-vivo perfusion of the liver. *Am. J. Surg.*, 111: 870, 1966.
- 8) Eiseman, B., Spencer, F. C., Koh, Y., Normell, L. and Knipe, P.: Factors affecting hepatic vascular resistance in

- the perfused liver. *Ann. Surg.*, 157 : 532~547, 1963.
- 9) Kestena, P. J. and McDermott, W. V. Jr. : Perfusion and replacement of the canine liver. *Surgery*, 50 : 196~206, 1961.
  - 10) Kestena, P. J., Mikaloff, P. L., Haxha, J. J., Dureau, G., Alexandre, G., Rassat, J. P., Cuilleret, J., Hassoun, A., Dubernard, M., Descoites, J., and Morella, J. : Homotransplantation of the canine liver after hyperthermic perfusion of long duration. *Bull. Soc. Int. Chir.*, 66 : 647~659, 1966.
  - 11) Turner, M. D. and Allcan, F. : Successful 20-hours storage of the canine liver by continuous hypothermic perfusion. *Cryobiology*, 6 : 293~301, 1970.
  - 12) Slapack, M., Wigmore, R. A. and MacLean, I. D. : Twenty-four hour liver preservation by the use of continuous pulsatile perfusion and hyperbaric oxygen. *Transplantation*, 5 : 1154~1158, 1967.
  - 13) Brettschneider, L., Daloz, P. M., Huguet, C., Porter, K. A., Groth, C. G., Kashiwagi, N., Hutchison, D. E. and Starzl, T. E. : The use of combined preservation techniques for extended storage of orthotopic liver homografts. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 126 : 263~274, 1968.
  - 14) Hinchliffe, A., Immelman, E. J., Bowes, J. B., Hunt, A. C., White, H. J. O., Johnson, M. G., Golby, M., Pascock, J. H., and Riddell, A. G. : Transplantable apparatus for liver preservation. *Eur. Surg. Res.*, 2 : 427, 1970.
  - 15) Belzer, G. O., Roy May, M. B., Berry, M. N., Phil, D. and Lee, J. C. : Short term preservation of porcine livers. *J. Surg. Res.*, 10 : 55~61, 1970.
  - 16) Petrie, C. R., Woods, J. E. and Minn, R. : Successful 24-hour preservation of the canine liver. *Arch. Surg.*, 107 : 461~464, 1973.
  - 17) 出月康夫, 牧 隆, 笠原小五郎, 棚谷登, 赤羽俊雄 : 4°C 間歇的無血灌流による肝保存および同種移植の研究. 移植, 7 : 199~207, 1972.
  - 18) Calne, R. Y., Dunn, D. C., Herbertson, B. M., Gordon, E. M., Bitter-Suermann, H., Robson, A. J., Macdonald, A. S., Davis, D. R., Smith, D. P., Reitter, F. H. and Webster, I. M. : Liver preservation by single passage hypothermic "Scler" perfusion. *Br. Med. J.*, 21 : 142~145, 1972.
  - 19) Toledo-Pereyra, L. H., Choe, M., Lillikeh, R. C. and Condie, R. M. : Liver preservation by cold storage with hyperosmolar solutions for twenty-four hours. *Cryobiology*, 16 : 43~49, 1979.
  - 20) Grana, L., Saldana, M., Donnellan, W. L. and Swenson, O. : Immediate and long-term effects of acute hepatic ischemia II : Vascular lesions in experimental liver ischemia. *Arch. Surg.*, 97 : 500~513, 1968.
  - 21) 草野漢夫, 玉置明, 水戸地郎 : 同所性同種肝移植の実験的研究 : 屍体内保存肝の電顕的考察. 第10回日本移植学会講演, 1974.
  - 22) Wall, W. J., Calne, R. Y., Herbertson, B. M., Baker, P. G., Smith, D. P., Underwood, J., Kostakis, A. and Williams, R. : Simple hypothermic preservation for transporting human livers long distances for transplantation : Report of 12 cases. *Transplantation*, 23 : 210~216, 1977.
  - 23) Mito, M., Tamaki, A., Kon, T., Ohira, S. and Mikami, J. : Experimental studies on differential hypothermia of the liver. *J. Surg. Res.*, 10 : 207~212, 1965.
  - 24) Brown, H., Patel, J., Barsamian, E. M., Collins, S. C. and McDermott, W. V. : Cold preservation of liver for homotransplantation. *Surgical Forum*, 15 : 215~217, 1964.
  - 25) Ottc, J. B., Lambotte, L., Squifflet, J. P., Moriau, M. and Kestena, P. J. : Successful orthotopic transplantation of the canine liver after prolonged preservation by initial perfusion and cold storage. *Eur. Surg. Res.*, 5 : 273~281, 1973.
  - 26) Fonkalarud, R. W., Rangel, D. M., Bufield, J., Bruckner, W., Stevens, G. H. and Diabar, A. : Hepatic preservation with chlorpromazine and phenoxymethamine : Application to liver transplantation. *Surgery*, 66 : 23~33, 1969.
  - 27) Rangel, D. M., Bruckner, W. L., Byfield, J. E., Diabar, A., Yskishih, Y., Stevens, G. H. and Fonkalarud, E. W. : Enzymatic evaluation of hepatic preservation using cell stabilizing drugs. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 129 : 953~972, 1969.
  - 28) Totovic, V., Lagace, R., Lie, T. S., Busselberg, E. and Yamamoto, T. : *Res. Exp. Med.*, 158 : 129~151, 1972.
  - 29) Lefer, A. M., Ogletree, M. L., Smith, J. B., Silver, M. J., Nicolau, K. C., Barnette, W. E. and Gasic, C. P. : Prostacyclin : A potentially valuable agent for preserving myocardial tissue in acute myocardial ischemia. *Science*, 200 : 52~54, 1978.
  - 30) Mocada, S., Gryglewski, R., Bunting, S. and Vane, J. R. : An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263 : 663~665, 1976.
  - 31) Araki, H. and Lefer, A. M. : Cytoprotective actions of prostacyclin during hypoxia in the isolated perfused cat liver. *Am. J. Physiol.*, 238 : H176~H181, 1980.
  - 32) Kamada, N., Calne, R. Y., Wight, D. G. D. and Linea, J. G. : Orthotopic rat liver transplantation after long-term preservation by continuous perfusion with fluorocarbon emulsion. *Transplantation*, 30 : 43~48, 1980.
  - 33) Mitsuno, T., Ohyanagi, H. and Yokoyama, K. : Development of a perfluorochemical emulsion as a blood gas carrier. *Artif. Organs*, 8 : 25~33, 1984.
  - 34) Honda, K. : Fundamental and clinical studies on intracardiac organ perfusion with Fluocel-DA. In *Advances in Blood Substitute Research*. Alan, R. Liss, New York, 1983, p. 327~330.
  - 35) Van Wyk, J., Kiem, D. S. and Eiseman, B. : Function of cadaver liver. *Surgery*, 58 : 120~130, 1965.
  - 36) Fonkalarud, E. W., Ono, H., Shafey, O. A., Joseph, W. L., Tocornal, J. and Longmire, W. P. Jr. : Allogenic canine liver transplantation with cadaver donors. *Surgery*, 62 : 333~339, 1967.
  - 37) 玉置明, 阿西紀夫, 川村明夫, 葛西真一, 斎藤功, 田田隆彦, 円谷敏彦, 佐藤雄次, 草野漢夫, 及川巖, 水戸地郎, 葛西洋一 : 屍体肝移植の実験的研究 : 屍体内保存肝の同所性肝移植. 日本移植学会雑誌, 9 : 153~160, 1973.
  - 38) Moss, G. S., Reed, P. C. and Riddell, A. G. : Observations on the effects of glycerol on the cold storage of the canine liver. *Surg. Res.*, 9 : 147~151, 1966.
  - 39) Zimmerman, G., Tennyson, C. and Drapanas, T. : Studies of preservation of liver and pancreas by freezing techniques. *Transplant. Proc.*, 8 : 657~659, 1971.
  - 40) Toledo-Pereyra, L. H. : Factors involved in successful freezing of kidneys for transplantation : Preliminary experimental observations. *J. Surg. Res.*, 28 : 563~570, 1980.

- 41) Toledo-Pereyra, L. H., Gordon, D. and MacKenzie, G.: Cryopreservation of whole pancreas versus islet cells. *Transaction ASAIO*, 27: 259~261, 1981.
- 42) Hamilton, R. and Lehr, H. B.: Survival of small intestine after for seven days at  $-197^{\circ}\text{C}$ . *Cryobiology*, 8: 375, 1967.
- 43) Mito, M., Ebata, H., Kusano, M., Onishi, T., Saito, T. and Sakamoto, S.: Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. *Transplantation*, 28: 499~505, 1978.
- 44) Fuller, B. J., Morris, G. J., Nutt, L. H.: Functional recovery of isolated rat hepatocytes upon thawing from  $-196^{\circ}\text{C}$ . *Cryoletters*, 1: 133, 1980.
- 45) Kusano, M., Ebata, H., Onishi, T., Saito, T. and Mito, M.: Transplantation of cryopreserved isolated hepatocytes into the rat spleen. *Transplant. Proc.*, 13: 848~854, 1981.
- 46) 水戸超郎, 京野満夫: 長期凍結保存肝細胞の脾内移植. 外科治療, 51: 126~127, 1984.
- 47) Fuller, B. J., Woods, R. J., Nutt, L. H. and Attenburrow, V. D.: Survival of Hepatocytes Upon Thawing From  $-196^{\circ}\text{C}$ : Functional Assessment After Transplantation. *Organ Preservation Basic and Applied Aspects, A Symposium of the Transplantation Society*, ed. by Pegg, D. B., Jacobsen, I. A. and Halasz, N. A., MTP Press, Lancaster, Boston, Hague, 1979, p. 381.
- 48) Ebata, H. and Mito, M.: Intrasplicic fetal rat hepatic tissue isotransplantation. *Transplantation*, 1985 (in press).
- 49) 澤田之, 坂田博美, 及川麗, 草野満夫, 高西良一, 江坂英隆, 関口定英, 水戸超郎: 胎児肝の凍結保存とその影響に関する研究. 肝臓, 25(Suppl.): 66, 1984.
- 50) Kamada, N. and Calne, R. Y.: Orthotopic liver transplantation in the rat: Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation*, 28: 47~80, 1979.